

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591621

研究課題名（和文） 小口径人工血管の長期開存性向上をめざした遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Gene therapy for the extension of small caliber prosthesis patency

研究代表者

山田 就久（YAMADA NARIHISA）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：00397283

研究成果の概要

本研究は小口径人工血管の長期開存性の向上を得る遺伝子治療の開発を目的としている。

イヌ頸動脈人工血管置換モデル(Dacronグラフト使用)にて、ヒトPD-ECGF (/hTP) をDDS(プルロニックゲル)を用いて投与し、治療効果を検討した。術後4週にて、遺伝子投与群で吻合部周囲の新生内膜肥厚抑制を認めた。しかし人工血管内腔への内皮細胞浸潤や抗血栓性などその他の因子においては効果を認めなかった。この結果、ヒトPD-ECGF (/hTP)は術後開存性を悪化させる吻合部狭窄に対し治療効果を認めたが、人工血管内腔に対する治療効果の改善には、投与方法など更なる工夫が必要になると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：遺伝子治療、人工血管

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究では、小口径人工血管の長期開存性の向上を得るための遺伝子治療を開発することを目的とする。臨床においては末梢血管に対するバイパス術では、大伏在静脈が使用不能の場合は人工血管の使用を余儀なくされるが、人工血管を使用した場合、大伏在静脈を用いた場合と比較して術後グラフトの早期閉塞、あるいは長期開存率が低下することは避けられず、血管外科領域では未だ解

決されていない問題である。その病因としては、人工血管内壁への早期血栓症と、後期では人工血管の両端の動脈より始まる血管平滑筋細胞の過剰増殖および内膜の遊走による新生内膜の肥厚が起こるためと言われており、これらを制御することができれば小口径人工血管の長期開存が期待できるはずである。

(2) 我々はこれまでに血小板由来内皮細胞成長因子 (PD-ECGF) を用いた慢性虚血心筋

に対する遺伝子治療の研究を行い、血管新生促進作用、心筋細胞のアポトーシスの抑制作用、心機能改善効果などを明らかにした。またラットの培養血管平滑筋細胞に PD-ECGF 遺伝子を導入することにより、hemeoxygenase-1 (HO-1) と p27KIP1 の発現上昇を介して血管平滑筋細胞の増殖と遊走能が抑制されることを明らかにした。以上の成績をふまえ、PD-ECGF 遺伝子治療により自己の動脈と人工血管との吻合部における血管平滑筋細胞の過剰増殖を抑制する事ができれば遠隔期におけるグラフト不全が予防できるものと考えた。

2. 研究の目的

(1) 人工血管早期閉塞の原因の一つはグラフトが動脈システムに曝されることにより、グラフト両端の血管内皮細胞が障害され、凝固系カスケードが活性化されることによる血栓の形成である。従って、グラフト両端、および新生内皮の障害を軽減、あるいは内皮の修復を促進すれば、グラフト早期不全を予防することが可能と考えられる。PD-ECGF は① 血管内皮細胞に対して遊走特性を持つ、② 平滑筋細胞の増殖能および遊走能を抑制する、③ アポトーシスを抑制する、④ 壊死組織から放出した DNA をそのまま利用できるなどの特徴がある。また、PD-ECGF 遺伝子が局所に導入され発現すると、その酵素活性により産生された産物が自由に細胞に進出し、remote area にも作用できることから、血管細胞に導入すると、同時に内皮の治療の促進効果および平滑筋細胞の増殖と遊走抑制効果を期待できる。そこで、本研究ではプラスミドベクターに組み込んだヒト PD-ECGF 遺伝子を人工血管を移植する際に人工血管内壁面に投与することにより、新生内膜肥厚の抑制する事が可能か否かを検討し、遺伝子治療による人工血管グラフト不全に対する予防法を開発することを目的とする。この研究において、人工血管グラフトに対する PD-ECGF の効果が確認できれば、血管外科領域のみならず、動脈硬化性疾患の治療にも応用することが可能になる。

(2) 高齢化社会が進むにつれ動脈硬化性疾患が著しく増加しており、四肢末梢血管に対するバイパス手術を必要とする患者は年々増加している。近年、人工血管グラフトの吻合部の内膜肥厚に対して HGF 遺伝子導入による研究が行われているが、未だ有効な報告はなされていない。本研究における PD-ECGF 遺伝子導入により内膜肥厚の抑制、内皮細胞の修復促進による人工血管グラフト不全を予防できることが明らかになれば、将来人工血管バイパス手術の成績は飛躍的

に改善されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 治療用プラスミドベクターの大量精製

ヒト PD-ECGF 遺伝子の cDNA を組み込んだ哺乳類に発現するプラスミドベクター pCITP、LacZ 遺伝子を組み込んだベクター pCILacZ は Qiagen の Endofree plasmid Extraction Giga kit を用い精製する（2種類のベクターはすでに作成済み、当研究室が保有している）。

(2) DDS の検討

ドラッグデリバリーシステム (DDS) の検討をヒアルロン酸ゲル、フィブリンゲル、キトサンゲル、エラスチンゲル、プルロニックゲルを候補として細胞毒性、生体溶解性、組織寛容性の検討を行う。

細胞毒性に関してはラット大動脈平滑筋細胞を用いた MTT assay (in vitro) にて評価する。

組織寛容性に関しては、ゲルをラット後肢内転筋に挿入、2、4 週後に周囲組織ごと摘出し免疫組織学染色にて炎症細胞及び異物型巨細胞浸潤の程度、Masson's trichrome 染色にてゲル周囲における繊維化の程度を比較する。

また同時にゲル内に遺伝子を取り込ませ、その発現についても評価を行う。

(3) ウサギ大動脈バイパスモデルの作成

雄性 New Zealand White rabbit (体重 3-4kg) を用いる。全身麻酔下、無菌的に腹部正中切開でアプローチし腹部大動脈を全周性に剥離、露出する。ヘパリン 1,000 単位を耳縁静脈から投与後、腹部大動脈を遮断鉗子で遮断し、約 25mm 長の大動脈を直径 3mm の Woven Dacron グラフトの人工血管グラフトで置換する (8-0 monofilament polypropylene 糸で端々吻合)。

人工血管置換後、グラフト周囲より上記 DDS を用い遺伝子を投与し、閉腹する。

投与する遺伝子より以下の 3 群に分け評価を行う。

- 1) 対照群 1 : 生理食塩水+DDS を投与。
- 2) 対照群 2 : pCILacZ+DDS を投与。
- 3) 治療群 : pCITP+DDS を投与。

術後抗凝固療法としてアスピリンを投与する。

(4) 評価

① 血管エコー検査、血流量測定
人工血管をバイパスした後、グラフトを摘出前 (2 週間、8 週間) に血管エコー検査 (開

胸下での直接血管エコー)を行いグラフトの内径、血流速を測定し、血管内膜の性状を観察する。

② 分子生物学検査

1. LacZ 遺伝子治療は X-gal 染色により遺伝子発現を評価する。
2. PD-ECFG 遺伝子治療群は、人工血管内膜組織から RNA および蛋白質を抽出して、RT-PCR、Western blot 法、活性測定法、および抗 PD-ECGF 抗体を用いた免疫組織化学染色により発現を評価する。

③ 組織学検査

1. H-E 染色、Elastica von Gieson 染色によりグラフトの新生内膜肥厚を評価し、遺伝子治療により内膜肥厚への影響を検討する。
2. 抗増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体および平滑筋細胞 α -actin 抗体を用いた二重免疫組織化学染色により増殖平滑筋細胞を評価する。
3. 抗 von Willbrand factor 抗体を用いて、血管内皮を染色して、内皮の整合性を評価する。

4. 研究成果

(1) 治療用プラスミドベクターの大量精製

先ず治療用遺伝子としてヒト PD-ECGF、対照遺伝子として LacZ 遺伝子を用いることとし、これらを組み込んだプラスミドベクター (pCIhTP、pCILacZ) を作製した。

更にこれを遺伝治療に用いる為、Qiagen の Endofree plasmid Extraction Giga kit を用い大量精製した。

(2) DDS の検討

前述のゲルを用いドラッグデリバリーシステム (DDS) の検討を行った。

細胞毒性に関しては、MTT assay にてキトサンゲル及びエラスチンゲルで細胞増殖能の低下を認めた。

また生体溶解性に関して、2 週間ではフィブリンゲル、プルロニックゲルは完全に溶解していた。その他のゲルについては 4 週間もまだ残存していた。

組織寛容性の検討では 2 週後はキトサンゲル及びエラスチンゲルで炎症細胞の浸潤・異物型巨細胞の浸潤を多く認めたが、4 週間ではフィブリンゲル、プルロニックゲルがその他のゲルと比較して抑制されていた。

周囲の繊維化においてもキトサンゲル及びエラスチンゲルで増加していた。

また、導入された遺伝子の発現に関してはゲルの溶解性に比例していると考えられ、フィブリンゲル、プルロニックゲルにおいて優

れていた。

この結果、及び当施設におけるこれまでの報告に基づき、プルロニックゲルを DDS として用いることとした。

(3) ウサギ大動脈バイパスモデルの作成

同時に、腹部大動脈バイパスモデルの作成を行った。当初胸部下行大動脈を予定していたが、手術侵襲が大きくその後の経過観察が困難であった為、腹部大動脈バイパスモデルへと変更した。

遺伝子は pCIhTP、pCILacZ を $500 \mu\text{g}$ をそれぞれ投与した。

しかしこのモデルでは 3 群とも、全例術後 2 ~ 3 日で死亡した。剖検すると人工血管の血栓閉塞を認めた。このままでは新生内膜肥厚の評価を行うことが困難となるため、術中術後の抗凝固療法の見直しが必要であると考えられた。

これに対し、術後抗凝固療法やゲルによる人工血管外周からのヘパリン投与による抑制を試みるも、血栓形成によるバイパスの閉塞を回避することは困難であった。

この為、イヌ頸動脈バイパスモデルを用いて評価を行うこととし、実験を継続させた。イヌ (ビーグルを全身麻酔下、無菌的に両側総頸動脈を剥離し、約 2 cm 長の総頸動脈を置換した。置換した人工血管に対し、プルロニックゲルを DDS として、プラスミドベクター (pCIhTP、pCILacZ) を投与した。

バイパス術後 2 週にて遺伝子導入・発現、4 週にて血管エコー検査、血流量測定及び免疫組織学検査を行い人工血管グラフト不全の評価を行った。

(4) 遺伝子導入・発現

術後 2 週において、遺伝子導入の有無につき PCR 検査、western blot、免疫組織学検査において評価した。

治療群、対照群ともに遺伝子の導入・発現が確認された。

(5) グラフト不全の評価

血管超音波検査において TP 投与群では対照群に比べ、吻合部周囲において新生内膜肥厚は抑制されていた。このことは組織化学検査でも確認された。対照群の新生内膜肥厚は主に血管平滑筋細胞の増殖であった。

一方、人工血管内腔に対する両者の違いについては明らかにすることはできなかった。血管内皮細胞のグラフト内腔への進展も差違を認めなかった。

(6) 考察

現在、末梢血管に対するバイパス術では、人工血管は術後グラフトの早期閉塞、長期開存率低下等の問題により実用的とはいえない。その病因は、人工血管内壁への早期血栓症と、人工血管の両端の新生内膜の肥厚であると知られている。これらを制御することが小口径人工血管の長期開存性向上への鍵となる。

当施設ではこれまでにPD-ECGFの新生内膜肥厚に対する治療効果を確認している。

しかしそれらは傷害動脈及び静脈グラフトを対象としており、本研究の人工血管に対する治療効果を検討したものではない。

本研究においても同様に吻合部における新生内膜肥厚の抑制効果を認めており、このことは人工血管長期開存性向上に有効であると考えられた。

最近の狭小人工血管開存性に対する研究では、主にePTFEグラフトを用いる報告が多いが、これはePTFEグラフトが抗血栓性に優れている点が大きな一つの要因であると考えられる。

今回我々は人工血管にWoven Dacronグラフトを使用した。これは上記の抗血栓性に対する知見と反するものであるが、ハイドロゲルを用いる遺伝子の投与方法にはWoven Dacronグラフトの方が適していると考えたためである。更にPD-ECGFには内皮細胞の遊走を促進させる作用があり、これにより人工血管内腔への内皮細胞進展が促され、血栓形成を抑制できると考えた為であった。しかし、ウサギのバイパスモデルでは血栓症を抑制することができず、イヌのモデルにおいても術後4週においては内皮細胞の進展に効果的であったとはいえず、このことはDDSを含めた投与方法及び投与量、術後一定期間の抗凝固療法の追加等の検討が必要だと考えられた。

(7) 結果

人工血管バイパス術で術後開存性を悪化させる吻合部狭窄においてTPは一定の効果を認めたが、人工血管腔への内皮細胞浸潤や抗血栓性などその他の因子においては、投与方法など更なる工夫が必要になると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

① Li W, Tanaka K, Morioka K, Takamori A, Handa M, Yamada N, Ihaya A. Long-term effect of gene therapy for chronic ischemic myocardium using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs. J Gene Med. 2008 Apr;10(4):412-20.、査読有

② Handa M, Li W, Morioka K, Takamori A, Yamada N, Ihaya A. Adventitial delivery of platelet-derived endothelial cell growth factor gene prevented intimal hyperplasia of vein graft. J Vasc Surg. 2008 Dec;48(6):1566-74.、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 就久 (YAMADA NARIHISA)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：00397283

(2) 研究分担者

井隼 彰夫 (IHAYA AKIO)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：70142841

森岡 浩一 (MORIOKA KOUICHI)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80210144

高森 督 (TAKAMORI ATSUSHI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：80397273

田中 國義 (TANAKA KUNIYOSHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：70144251

(平成19年度のみ)

半田 充輝 (HANDA MITSUTERU)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60402004

(平成19年度のみ)